

BEST AVAILABLE COPY

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

20.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年 1 0 月 2 0 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 3 5 9 7 0 4  
Application Number:  
[ST. 10/C] :            [ J P 2 0 0 3 - 3 5 9 7 0 4 ]

出 願 人            株式会社ロコモジェン  
Applicant(s):

REC'D 09 DEC 2004

WIPO

REC'D 09 DEC 2004

WIPO

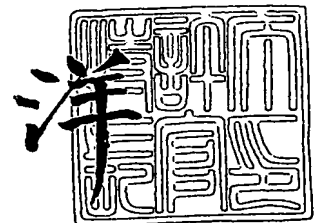
PCT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-0112  
【提出日】 平成15年10月20日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 A61K 48/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市都筑区中川 1-2-5 港北ガーデンヒルズ A棟  
                            503号  
    【氏名】 中島 利博  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区寺尾台 1-21-16 大滝ハイツ 201  
                            号  
    【氏名】 天野 徹也  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区新石川 2-16-7 石川坂マンション 3  
                            05号  
    【氏名】 山崎 聡士  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県横浜市港南区日野中央 2-39-9 コスモ港南台 50  
                            7号  
    【氏名】 八木下 尚子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-31-13 ハイツマリア 202  
                            号  
    【氏名】 池田 理恵  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都豊島区駒込 6-9-20 サンコーポ山名 102号  
    【氏名】 張 薔  
【特許出願人】  
    【識別番号】 503302207  
    【氏名又は名称】 株式会社ロコモジェン  
【代理人】  
    【識別番号】 100092783  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 浩  
    【電話番号】 03-3273-2611  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100095360  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 片山 英二  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100093676  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 小林 純子  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100120134  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 大森 規雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 157061

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 特許請求の範囲 1

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0314062

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を含む医薬組成物。

**【請求項 2】**

セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質が、シノビオリンの発現抑制物質である請求項 1 記載の医薬組成物。

**【請求項 3】**

セクレターゼが  $\beta$ -セクレターゼ又は  $\gamma$ -セクレターゼである請求項 1 又は 2 記載の医薬組成物。

**【請求項 4】**

シノビオリンの発現抑制物質が、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA 又は shRNA である請求項 2 記載の医薬組成物。

**【請求項 5】**

シノビオリンをコードする遺伝子が、配列番号 1 に示される塩基配列を含むものである請求項 4 記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

siRNA が、配列番号 1 に示す塩基配列のうち一部の配列を標的とするものである請求項 4 記載の医薬組成物。

**【請求項 7】**

一部の配列が、配列番号 2 ～ 15 に示す塩基配列から選ばれる少なくとも 1 つである請求項 6 記載の医薬組成物。

**【請求項 8】**

脳神経系疾患を治療するための請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

**【請求項 9】**

脳神経系疾患がアルツハイマー病である請求項 8 記載の医薬組成物。

**【請求項 10】**

シノビオリンの発現を抑制することを特徴とする、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する方法。

**【請求項 11】**

セクレターゼが  $\beta$ -セクレターゼ又は  $\gamma$ -セクレターゼである請求項 10 記載の方法。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する方法

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する方法、及びセクレターゼ阻害剤の感受性を促進させる物質を含む医薬組成物に関する。

## 【背景技術】

【0002】

シノビオリンは、リウマチ患者由来滑膜細胞に存在する膜タンパク質として発見された新規タンパク質である (W002/05207)。遺伝子改変動物を用いた研究により、骨・関節の発生および関節症の発症に同因子が直接関与することが明らかとなったことから、シノビオリンは正常な骨形成又は四肢の発達に貢献する活性を有するタンパク質であると考えられる。

【0003】

シノビオリンの発現は、骨・関節にとどまらず全身にユビキタスにみられるため、シノビオリンの生体内での機能を解析するためには、シノビオリンと結合する因子の探索が有力な手法となる。特に、シノビオリンの基質タンパク質を検出することは、シノビオリンが関与する細胞内シグナル伝達経路の同定に重要な手係りになると考えられる。

【0004】

そこで、本発明者は、シノビオリンがどのような細胞内シグナル伝達経路に関わっているかを解明するために、シノビオリンをBaitとしたYeast Two Hybrid法によりシノビオリンと結合する因子の探索を行なった。その結果、Herp (homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress-inducible ubiquitin-like domain member 1) と呼ばれるタンパク質がシノビオリンと相互作用をもつ分子として同定された。Herpとは、1996年にMiyataらによって血管内皮細胞のホモシステイン応答性遺伝子の産物として発見されたタンパク質である (非特許文献1)。

【0005】

その後の研究によって、Herpは、小胞体ストレスによって発現が誘導され、構造的にはN末端側にubiquitin-like domainをもつ膜タンパク質であることが明らかとなった (非特許文献2)。また、Herpは、家族性アルツハイマー病 (FAD) の原因遺伝子とされているプレセニリン (PS) と相互作用をもち $\beta$ -アミロイドタンパク質 ( $A\beta$ ) の膜内切断に関わるタンパク質分解酵素である $\gamma$ -セクレターゼ ( $\gamma$ -secretase) の活性を上昇させるということが報告されている (非特許文献3)。

【0006】

アルツハイマー病は、高齢化が進む現代において高い関心が払われている疾患の一つである。その最も重要な特徴は、脳に老人斑、すなわち繊維状の $\beta$ -アミロイドタンパク質 ( $A\beta$ ) の沈着が観察されることである。そして、 $\beta$ タンパク質は、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が $\beta$ -セクレターゼと $\gamma$ -セクレターゼによって切断されることにより生じるタンパク質であり、アルツハイマー病患者では、この切り出しが増加している。

【0007】

従って、セクレターゼの酵素活性を阻害する物質は、アルツハイマー病の治療薬として注目され、世界中でスクリーニングが行われている。

【0008】

しかし、候補物質は幾つか得られているものの、未だにセクレターゼ阻害剤の開発は成功していない。

【非特許文献1】 Kokame K, Kato H, Miyata T. Homocysteine-respondent Genes in Vascular Endothelial Cells Identified by Differential Display Analysis. J. Biol. Chem. 1996 Nov 22; 271(47): 29659-29665

【非特許文献2】 Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T. Herp, a New Ubiquitin-like Membrane Protein Induced by Endoplasmic Reticulum Stress. J. Biol. C

hem. 2000 Oct 20; 275(42): 32846-32853

【非特許文献3】 Sai X, Kawamura Y, Kokame K, Yamaguchi H, Shiraishi H, Suzuki R, Suzuki T, Kawaichi M, Miyata T, Kitamura T, Strooper BD, Yanagisawa K, Komano H. J. Biol. Chem. 277(15):12915-12920

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、脳神経疾患、特にアルツハイマー病を治療するために有用な薬剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質に着目し、当該物質を用いるとアルツハイマー病を治療し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を含む医薬組成物。

【0012】

セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質としては、シノビオリンの発現抑制物質（例えば、シノビオリンをコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNA）が挙げられる。シノビオリンをコードする遺伝子は、配列番号1に示されるものを含む。セクレターゼとしては、 $\beta$ -セクレターゼ又は $\gamma$ -セクレターゼが挙げられる。

【0013】

本発明においては、siRNAとして、配列番号1に示す塩基配列のうち、一部の配列を標的とするもの、例えば配列番号2～15に示す塩基配列から選ばれる少なくとも1つを標的として使用することが可能である。

【0014】

上記医薬組成物は、アルツハイマー病などの脳神経系疾患を治療するために用いられる。

。(2) シノビオリンの発現又はシノビオリンの活性を抑制することを特徴とする、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する方法。

【0015】

セクレターゼとしては、 $\beta$ -セクレターゼ又は $\gamma$ -セクレターゼが挙げられる。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を含む医薬組成物が提供される。本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病などの脳神経系疾患治療薬として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0018】

本発明者は、シノビオリンがアルツハイマー病の発症機序に関与する可能性に着目し、シノビオリンの発現をノックアウトした細胞において、セクレターゼ阻害剤の感受性が高まることを明らかにした。このことは、シノビオリンの発現を阻害させた状態において、セクレターゼ阻害剤の感受性が促進されることを意味しており、シノビオリンの欠失を介してセクレターゼ阻害剤の感受性が促進されることを示すものである。そして、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を用いることが、アルツハイマー病の治療につながることを実証した。

1. 概要

前述の通り、アルツハイマー病においては、セクレターゼ（例えば $\gamma$ -セクレターゼ活性）によってAPPが切り出され、 $A\beta$ が蓄積して老人斑が形成される。そこで本発明者は、セクレターゼ阻害剤の感受性に着目し、当該阻害剤の感受性を高めることによって $A\beta$ の蓄積並びに老人斑の形成を抑制するというプロセスの構築を考えた。

#### 【0019】

従って、本発明はセクレターゼ阻害剤の感受性を促進させることにより、 $A\beta$ の蓄積を抑えることを特徴とする。そして、 $A\beta$ 蓄積を抑えることで、老人斑の形成を抑制し、アルツハイマー病の治療を行うことが可能となる。

#### 【0020】

シノビオリンは全身に発現が認められるタンパク質であり、生体において必須な機能を司ることが示されている。このため、シノビオリンの生体内での機能を解明することが求められていた。一般に、タンパク質の機能を明らかにするには、シノビオリンと結合する因子の探索が有力な手法のひとつに挙げられ、特に、シノビオリンの基質タンパク質を検出することは、シノビオリンが関与する細胞内シグナル伝達経路の同定に重要な手係りになると考えられる。

#### 【0021】

そこで、シノビオリンがどのような細胞内シグナル伝達経路に関わっているかを解明するために、本発明者は、前述の通り、酵母内での結合実験及びGST Pull-down assayにより、シノビオリンとHerpが相互作用をもつことを示した。次に細胞内での相互作用を確認するために、シノビオリンとHerpをHEK293細胞に共発現させ免疫沈降によって観察したところ、酵母内・in vitroアッセイの結果と同様にシノビオリンとHerpの相互作用がみられた。このことは、シノビオリンがHerpと相互作用することを裏付けるものである。そして、タンパク質構造予測システムにより、シノビオリンにRING finger モチーフの存在が示された。このモチーフは蛋白質の分解に関わるE3ユビキチン-蛋白質リガーゼに存在することが知られている。またRing finger モチーフは、E2ユビキチン結合酵素の結合部位と考えられている。

#### 【0022】

従って、シノビオリンは、アルツハイマー病の発症機序、特に、セクレターゼ活性に関与すると考えられた。

## 2. シノビオリン発現阻害及び活性阻害

セクレターゼ阻害剤の感受性を高めるためには、シノビオリンの発現を阻害する方法が採用される。

#### 【0023】

シノビオリンの発現阻害には、特に限定されるものではないが、例えばRNA干渉（RNAi）を利用することができる。シノビオリン遺伝子に対するsiRNA(small interfering RNA)を設計及び合成し、これを細胞内に導入させることによって、RNAiを引き起こすことができる。

#### 【0024】

RNAiとは、dsRNA(double-strand RNA)が標的遺伝子に特異的かつ選択的に結合し、当該標的遺伝子を切断することによりその発現を効率よく阻害する現象である。例えば、dsRNAを細胞内に導入すると、そのRNAと相同配列の遺伝子の発現が抑制（ノックダウン）される。

#### 【0025】

siRNAの設計は、以下の通り行なうことができる。

#### 【0026】

(a) シノビオリンをコードする遺伝子であれば特に限定されるものではなく、任意の領域を全て候補にすることが可能である。例えば、ヒトの場合では、GenBank Accession number AB024690（配列番号1）の任意の領域を候補にすることができる。

#### 【0027】

(b) 選択した領域から、AAで始まる配列を選択し、その配列の長さは19~25塩基、好ましくは19~21塩基である。その配列のGC含量は、例えば40~60%となるものを選択するとよい。具体的には、配列番号1に示される塩基配列のうち、以下の塩基配列を含むDNAをsiRNAの標的配列として使用することができる。特に、(i) (配列番号2)、(ii) (配列番号3)、(vi) (配列番号7)、(vii) (配列番号8)、(viii) (配列番号9)を標的とすることが好ましい。

【0028】

- (i) AA TGTCTGCATCATCTGCCGA GA (配列番号2)
- (ii) AA GCTGTGACAGATGCCATCA TG (配列番号3)
- (iii) AA AGCTGTGACAGATGCCATC AT (配列番号4)
- (iv) AA GAAAGCTGTGACAGATGCC AT (配列番号5)
- (v) AA GGTTCCTGTGTACATGGCC TT (配列番号6)
- (vi) AA CAAGGCTGTGTACATGCTC TA (配列番号7)
- (vii) AA ATGTTTCCACTGGCTGGCT GA (配列番号8)
- (viii) AA GGTGTTCTTTGGGCAACTG AG (配列番号9)
- (ix) AA CATCCACACACTGCTGGAC GC (配列番号10)
- (x) AA CACCCTGTATCCAGATGCC AC (配列番号11)
- (xi) AA GGTGCACACCTTCCCACTC TT (配列番号12)
- (xii) AA TGTTTCCACTGGCTGGCTG AG (配列番号13)
- (xiii) AA GAGACTGCCCTGCAACCAC AT (配列番号14)
- (xiv) AA CGTTCCTGGTACGCCGTCA CA (配列番号15)

siRNAを細胞に導入するには、in vitroで合成したsiRNAをプラスミドDNAに連結してこれを細胞に導入する方法、2本のRNAをアニールする方法などを採用することができる。

【0029】

また、本発明は、RNAi効果をもたらすためにshRNAを使用することもできる。shRNAとは、ショートヘアピンRNA(short hairpin RNA)と呼ばれ、一本鎖の一部の領域が他の領域と相補鎖を形成するためにステムループ構造を有するRNA分子である。

【0030】

shRNAは、その一部がステムループを構造を形成するように設計することができる。例えば、ある領域の配列を配列Aとし、配列Aに対する相補鎖を配列Bとすると、配列A、スパーサー、配列Bの順になるようにこれらの配列が一本のRNA鎖に存在するようにし、全体で45~60塩基の長さとなるように設計する。配列Aは、標的となるシノビオリン遺伝子(配列番号1)の一部の領域の配列であり、標的領域は特に限定されるものではなく、任意の領域を候補にすることが可能である。そして配列Aの長さは19~25塩基、好ましくは19~21塩基である。

3. セクレターゼ阻害活性

セクレターゼ阻害剤の感受性を評価する方法として、アルツハイマー病患者の脳での感受性測定実験は倫理上極めて困難であり、他の評価系を用いる必要がある。そこで、本発明者は、細胞にセクレターゼ阻害剤を処置し、当該細胞の増殖活性をセクレターゼ阻害の指標とした評価系を用いる。ここで、セクレターゼの種類は特に限定されるものではなく、 $\beta$ -セクレターゼ、 $\gamma$ -セクレターゼが挙げられる。従って、セクレターゼ阻害剤は、 $\beta$ -セクレターゼ阻害剤及び $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤のいずれでもよい。

【0031】

細胞の増殖活性が抑制されたときに、セクレターゼ活性が阻害されたと判断する。つまり、細胞の増殖活性がより抑制されるほど、セクレターゼ阻害剤の作用、感受性が強いことになる。細胞は、野生型のシノビオリン遺伝子をもつマウス、及び、シノビオリン遺伝子をノックアウトさせたシノビオリン欠損マウスの胎児繊維芽細胞(MEF)を用いて、シノビオリンの発現の有無によるセクレターゼ阻害剤の感受性の変化を比較する。

【0032】



上記シノビオリン欠損細胞を用いて阻害剤の効果を調べた結果、シノビオリンを欠損した細胞の方が、シノビオリンを持っている野生型の細胞に比べ細胞増殖の低下がみられた。すなわち、シノビオリンを欠失すると、セクレターゼ阻害剤の感受性が促進したことを意味する。

#### 4. 医薬組成物

本発明において作製されたshRNA、siRNAは、シノビオリンの発現を抑制する物質であり、セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を含む医薬組成物（特にアルツハイマー病などの脳神経系疾患の遺伝子治療剤）として使用することができる。

##### 【0033】

本発明の医薬組成物を脳神経系疾患の遺伝子治療剤として使用する場合は、脳（大脳、間脳、中脳、小脳）、延髄、脊髄などの中枢神経系を対象として適用される。

##### 【0034】

上記脳神経系疾患は、単独であっても、併発したものであってもよい。

##### 【0035】

本発明の医薬組成物を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の医薬組成物を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ関連ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

##### 【0036】

また、本発明の医薬組成物をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。siRNAやshRNAを保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等の全身投与する。脳等に局所投与することもできる。

##### 【0037】

本発明の医薬組成物の投与量は、年齢、性別、症状、投与経路、投与回数、剤型によって異なるが、例えばアデノウイルスの場合の投与量は1日1回あたり $10^6 \sim 10^{13}$ 個程度であり、1週～8週間隔で投与される。

##### 【0038】

siRNA又はshRNAを目的の組織又は器官に導入するために、市販の遺伝子導入キット（例えばアデノエクスプレス：クロンテック社）を用いることもできる。

##### 【0039】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

##### 【実施例1】

##### 【0040】

Yeast Two Hybrid systemによるHerpのスクリーニング

Yeast Two Hybrid systemは、MATCHMAKER system (CLONTECH) を使い、酵母形質転換法 (Pro. Natl. Aca. Sci. USA, 88:9578-9582, 1991) で行った。

##### 【0041】

シノビオリンcDNAの706bpから1854bp又は805bpから1260bpの末端をEcoR I/Xho IとしpGBT9 vectorのEcoR I/Xho Iサイトに挿入した（以下、シノビオリンの706bpから1854bpをSyno dTM、805bpから1260bpをSyno Ringと呼ぶ。図1参照。）。

##### 【0042】

Herpのスクリーニングに用いるライブラリーはヒト軟骨由来のcDNAをpACT2 vectorに挿入したものをを用いた(pACT2-Y)。42℃、15分のヒートショックの後、酵母株Y190にpGBT9-Syno dTM又はpGBT9-Syno Ring(2.0 µg)、pACT2-Y(20 µg)を導入した。

##### 【0043】

各ベクターを導入したY190をTris-EDTA(pH7.5)緩衝液(TE)で洗浄後、SD-Trp-Leu-Hisプ

レートにTEで希釈したY190の溶液を広げ、30℃で10日培養した。現れてきたコロニーに対し、0.5mg/mlのX-galを基質とする $\beta$ ガラクトシダーゼフィルターアッセイを行い、陽性クローンを検出した。

#### 【0044】

陽性クローンをSD-Leu-His培地にて30℃で10日震盪培養し、アルカリ-SDS法(Methods Enzymol., 194:169-182, 1991)にてプラスミドDNAを抽出した。抽出したプラスミドDNAを大腸菌株HB101に形質転換し、M9プレート(-Leu)に広げ、37℃で2日培養した。現れてきたコロニーを20 $\mu$ g/ml LB培地で37℃、16時間震盪培養しアルカリ-SDS法によってプラスミドDNAを抽出した。

#### 【0045】

抽出したプラスミドDNAに挿入されているヒト軟骨由来のcDNA断片の解析にはBigDye Terminator Cycle Sequencing system (Applied Biosystems) を用いた。シークエンスの解析結果をBLASTにより検索した結果、ホモシステイン誘導性の小胞体タンパク質homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress-inducible ubiquitin-like domain member 1 (ACCESSION No. BC032673 以下、Herpと略す)を得た。

#### 【実施例2】

##### 【0046】

in vitroにおけるシノビオリンとHerpの結合

TNT-coupled Translation System (Promega) 及びシノビオリンの706bpから1854bpを挿入したpcDNA3-Flag-Syno dTMを作製した。これを用いてin vitro translationを行い、(i) Flag-Syno dTM融合タンパク質、(ii) HerpのGST融合タンパク質、(iii) 断片化したHerpのGST融合タンパク質を作製した(図2)。これらの融合タンパク質及び(iv)対照としてのGSTタンパク質を20mM Hepes(pH7.9), 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.05% Tween, 5% Glycerol, 1mM DTT, 0.2mM NaVO<sub>4</sub>, 5mM NaF, 1mM PMSFを含む結合バッファーに加え、4℃で16時間反応させた。その反応物についてSDS-PAGEを行い、イメージアナライザー(BAS2000, Fujix)で放射活性を検出した。

##### 【0047】

その結果、Herp-MとHerp-CのGST融合タンパク質と[<sup>35</sup>S] pcDNA3-Flag-Syno dTMの結合が観察された。

##### 【0048】

コントロールであるGSTとpcDNA3-Flag-Syno dTMとの結合は認められなかった(図3)。この結果から、シノビオリンとHerpは、タンパク質の相互作用により結合することが推測された。

#### 【実施例3】

##### 【0049】

in vivoにおけるシノビオリンとHerpの結合

HEK293細胞を10cm dishに2 X 10<sup>6</sup> cells蒔き、24時間培養後、シノビオリンの1bpから1854bpを挿入した pcDNA3-HA/Syno、及びHerpの1bpから1176bpを挿入したpcDNA3-Flag/Herpを、各3 $\mu$ gずつ遺伝子導入した。遺伝子導入して24時間後細胞を回収し、Lysis bufferに溶解後、抗HA及び抗Flag抗体で4℃下終夜免疫沈降を行った。遠心操作により結合タンパク質と遊離タンパク質を分け、ウェスタンブロット法により検出した。検出には抗HA及び抗Flag抗体を用いた。

##### 【0050】

その結果、シノビオリン及びHerpを共発現した細胞では、抗HA抗体を用いて免疫沈降後、抗Flag抗体で検出するとFlag-Herpのバンドを確認することができた。また、抗Flag抗体を用いて免疫沈降した後、抗HA抗体で検出するとHA-シノビオリンのバンドを確認することができた。この結果より、in vitro条件下と同様にシノビオリンとHerpは、タンパク質の相互作用により結合することが推測された(図4)。

#### 【実施例4】

##### 【0051】

シノビオリン欠失細胞での細胞増殖活性における $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の影響

シノビオリン遺伝子導入マウス（野生型マウス）及びシノビオリン遺伝子欠損マウスから得られた胎児繊維芽細胞（MEFs）を、96well plateに $1 \times 10^3$  cells/wellになるようにまき、終夜培養した。培養後の細胞に $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤（Wako）を処理し、24時間培養した後Alamer Blueを加え、2時間後に吸光度を測定した。

【0052】

図5より、シノビオリン欠損マウス胎児繊維芽細胞(Syno<sup>-/-</sup>)において $\gamma$ -セクレターゼ活性を阻害したものはシノビオリンマウス胎児繊維芽細胞(Syno<sup>+/+</sup>)と比較して細胞の増殖活性の抑制がみられた。このことは、シノビオリンの有無で細胞の $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤への感受性が変化するということ、すなわち、シノビオリンを欠失すると $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の感受性が促進されるということを意味する。そのため、シノビオリンの抑制剤はアルツハイマー病の病理過程の第1段階とされているA $\beta$ の蓄積を調節することにより、アルツハイマー病の治療薬として利用することが出来る。

【図面の簡単な説明】

【0053】

【図1】シノビオリンの全長構造とbaitに用いたSyno dTM及びSyno Ringの構造を示す模式図。a.asはアミノ酸配列番号を示す。

【図2】Herpの全長構造と断片化したHerpの構造を示す模式図。a.asはアミノ酸配列番号を示す。UBQはユビキチンドメインを示す。

【図3】Flag-Syno dTMとHerp各コンストラクトとのGST融合タンパク質との結合実験の結果を示す図。シノビオリンとHerpはタンパク質の相互作用により結合することを示す。

【図4】HA/SynoとFlag/Herpとの免疫沈降実験の結果を示す図。IPは免疫沈降に用いた抗体の種類を示し、WBはウェスタンブロットに用いた抗体の種類を示す。\*印はIgG HC (IgG heavy chain、重鎖)を示す。

【図5】野生型及びシノビオリン欠損マウス胎児繊維芽細胞における $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の効果を示す図。黒いカラムは野生型マウス由来の細胞、白いカラムはシノビオリン欠損マウス由来の細胞を示す。シノビオリン欠損マウス由来の細胞では、 $\gamma$ -セクレターゼ阻害剤の作用が野生型マウス由来の細胞よりも顕著である。Tuni. はツニカマイシンを表す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Locomogene

&lt;120&gt; A method for promoting sensitivity of secretase inhibitor

&lt;130&gt; P03-0112

&lt;160&gt; 15

&lt;170&gt; PatentIn version 3.2

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3374

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

<400> 1  
gccctttctt atgagcatgc ctgtgttggg ttgacagtga gggtaataat gacttgttgg 60  
ttgattgtag atatagggct ctcccttgca aggtaattag gctccttaaa ttacctgtaa 120  
gattttcttg ccacagcatc cattctggtt aggctggtga tcttctgagt agtgatagat 180  
tggttgggtg tgaggtttac aggtgttccc ttctcttact cctggtgttg gctacaatca 240  
ggtggcgtct agagcagcat gggacagggt ggtaagggga gtcttctcat tatgcagaag 300  
tgatcaactt aaatctctgt cagatctacc tttatgtagc ccggcagtcg cgcggattga 360  
gcgggctcgc ggcgctgggt tcctggtctc cgggccaggg caatgttccg cacggcagtg 420  
atgatggcgg ccagcctggc gctgaccggg gctgtggtgg ctacgccta ctacctcaa 480  
caccagttct acccactgt ggtgtacctg accaagtcca gcccagcat ggcagtcctg 540  
tacatccagg cttttgtcct tgtcttcctt ctgggcaagg tgatgggcaa ggtgttcttt 600  
gggcaactga gggcagcaga gatggagcac cttctggaac gttcctggta cgccgtcaca 660  
gagacttgtc tggccttcac cgtttttcgg gatgacttca gccccgctt tgttgcactc 720  
ttcactcttc ttctcttcct caaatgtttc cactggctgg ctgaggaccg tgtggacttt 780  
atggaacgca gcccacat ctccctggctc tttcactgcc gcattgtctc tcttatgttc 840  
ctcctgggca tcctggactt cctcttcgtc agccacgcct atcacagcat cctgaccctg 900  
ggggcctctg tgcagctggt gtttggcttt gagtatgcca tcctgatgac gatggtgctc 960

accatcttca tcaagtatgt gctgcactcc gtggacctcc agagtgagaa cccctgggac 1020  
aacaaggctg tgtacatgct ctacacagag ctgtttacag gcttcatcaa ggttctgctg 1080  
tacatggcct tcatgaccat catgatcaag gtgcacacct tcccactctt tgccatccgg 1140  
cccatgtacc tggccatgag acagttcaag aaagctgtga cagatgccat catgtctcgc 1200  
cgagccatcc gcaacatgaa caccctgtat ccagatgcca cccagagga gctccaggca 1260  
atggacaatg tctgcatcat ctgccgagaa gagatgggtga ctggtgccaa gagactgccc 1320  
tgcaaccaca ttttccatac cagctgcctg cgctcctggg tccagcggca gcagacctgc 1380  
cccacctgcc gtatggatgt ccttcgtgca tcgctgccag cgcagtcacc accacccccg 1440  
gagcctgcgg atcagggggc accccctgcc cccaccccc caccactctt gcctcagccc 1500  
cccaacttcc cccagggcct cctgcctcct tttcctccag gcatgttccc actgtggccc 1560  
cccatgggcc cttttccacc tgtcccgctt cccccagct caggagaggc tgtggctcct 1620  
ccatccacca gtgcagcagc cttttctcgg cccagtggag cagctacaac cacagctgct 1680  
ggcaccagtg ctactgctgc ttctgccaca gcatctggcc caggctctgg ctctgcccc 1740  
gaggctggcc ctgcccctgg tttcccctt cctcctcct ggatgggtat gcccctgcct 1800  
ccaccctttg ctttcccccc aatgcctgtg ccccctgcgg gctttgctgg gctgacccca 1860  
gaggagctac gagctctgga gggccatgag cggcagcacc tggaggcccg gctgcagagc 1920  
ctgcgtaaca tccacacact gctggacgcc gccatgctgc agatcaacca gtacctcacc 1980  
gtgctggcct ccttggggcc cccccgcct gccacttcag tcaactccac tgaggggact 2040  
gccactacag ttgttgctgc tgcctcctcc accagcatcc ctagctcaga ggccacgacc 2100  
ccaaccccag gagcctcccc accagcccct gaaatggaaa ggctccagc tcctgagtca 2160  
gtgggcacag aggagatgcc tgaggatgga gagcccgatg cagcagagct ccgccggcgc 2220  
cgctgcaga agctggagtc tcctgttgcc cactgacact gcccagccc agcccagcc 2280  
tctgctcttt tgagcagccc tcgctggaac atgtcctgcc accaagtgcc agctccctct 2340  
ctgtctgcac caggagtag tacccccagc tctgagaaag aggcggcac ccctaggcca 2400  
agtggaaaga ggctgggggt cccatttgac tccagtcca ggcagccatg gggatctcgg 2460

gtcagttcca gccttcctct ccaactcttc agccctgtgt tctgctgggg ccatgaaggc 2520  
agaaggttta gcctctgaga agccctcttc ttccccacc ctttccagg agaaggggct 2580  
gccctccaa gccctacttg tatgtgcgga gtcacactgc agtgccgaac agtattagct 2640  
cccgttcca agtgtggact ccagaggggc tggaggcaag ctatgaactt gctcgtggc 2700  
ccaccctaa gactggtacc catttccttt tcttaccctg atctcccag aagcctcttg 2760  
tggtggtggc tgtgccccct atgccctgtg gcatttctgc gtcttactgg caaccacaca 2820  
actcagggaa aggaatgcct gggagtgggg gtgcaggcgg gcagcactga gggaccctgc 2880  
cccgccctc ccccaggcc ctttccct gcagcttctc aagtgagact gacctgtctc 2940  
accagcagc cactgcccag ccgcactcca ggcaagggcc agtgcgcctg ctcctgacca 3000  
ctgcaatccc agcgcccaag gaaggccact tctcaactgg cagaacttct gaagtttaga 3060  
attggaatta cttccttact agtgtctttt ggcttaaatt ttgtcttttg aagttgaatg 3120  
cttaatcccg ggaaagagga acaggagtgc cagactcctg gtctttccag ttagaaaag 3180  
gctctgtgcc aaggagggac cacaggagct gggacctgcc tgcccctgtc ctttcccctt 3240  
ggttttgtgt tacaagagtt gttggagaca gtttcagatg attatttaat ttgtaaatat 3300  
tgtacaaatt ttaatagctt aaattgtata tacagccaaa taaaaacttg cattaacaaa 3360  
aaaaaaaaa aaaa 3374

<210> 2  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 2  
aatgtctgca tcatctgccg aga 23

<210> 3  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 3  
aagctgtgac agatgccatc atg

23

<210> 4  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 4  
aaagctgtga cagatgccat cat 23

<210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
aagaaagctg tgacagatgc cat 23

<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
aaggttctgc tgtacatggc ctt 23

<210> 7  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
aacaaggctg tgtacatgct cta 23

<210> 8  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
aaatgtttcc actggctggc tga 23

<210> 9  
<211> 23  
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

aaggtgttct ttgggcaact gag

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

aacatccaca cactgctgga cgc

23

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

aacaccctgt atccagatgc cac

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

aaggtgcaca ctttccact ctt

23

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

aatgtttcca ctggctggct gag

23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

aagagactgc cctgcaacca cat

23



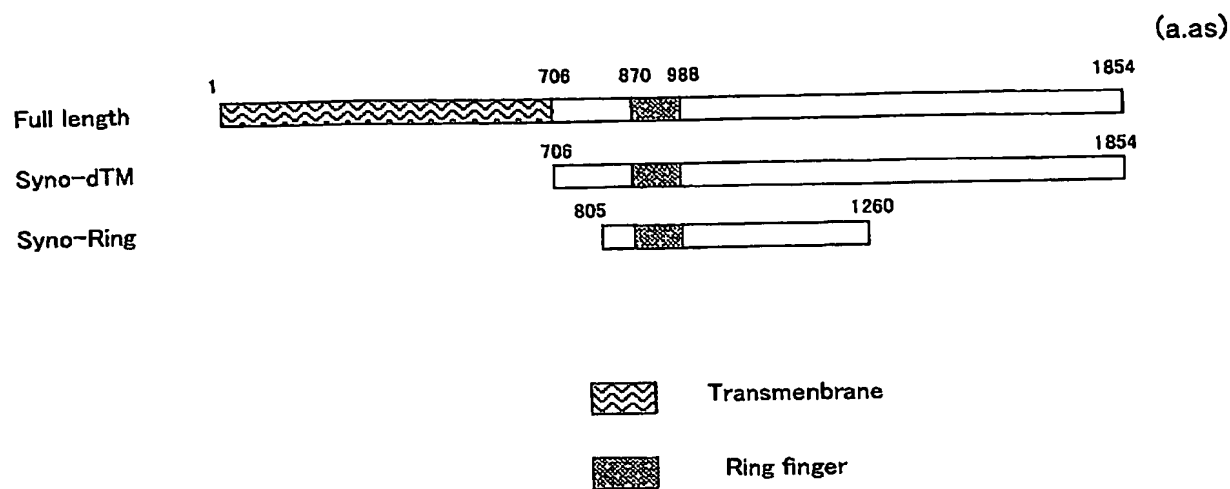
<210> 15  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
aacgttcctg gtacgccgtc aca

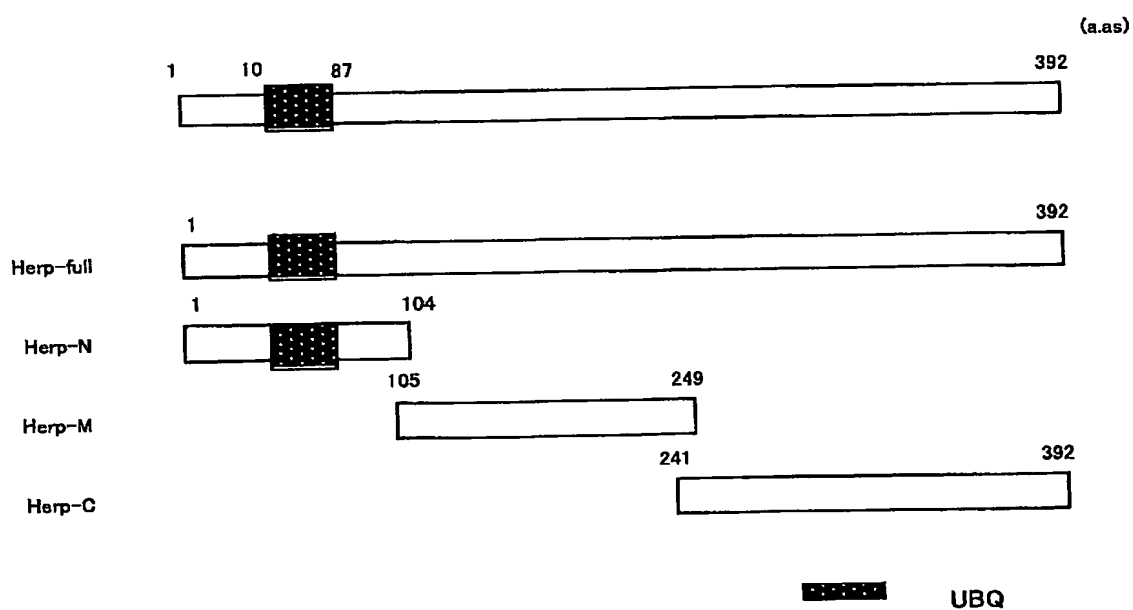
23

【書類名】 図面

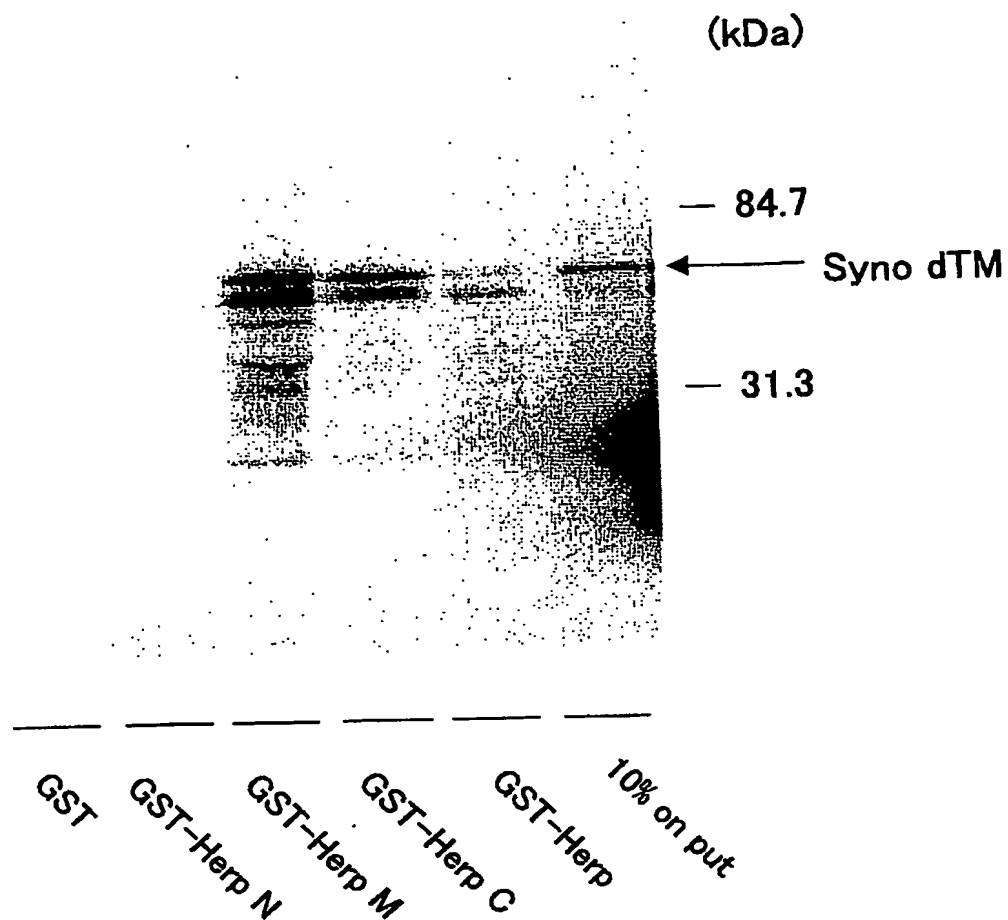
【図 1】



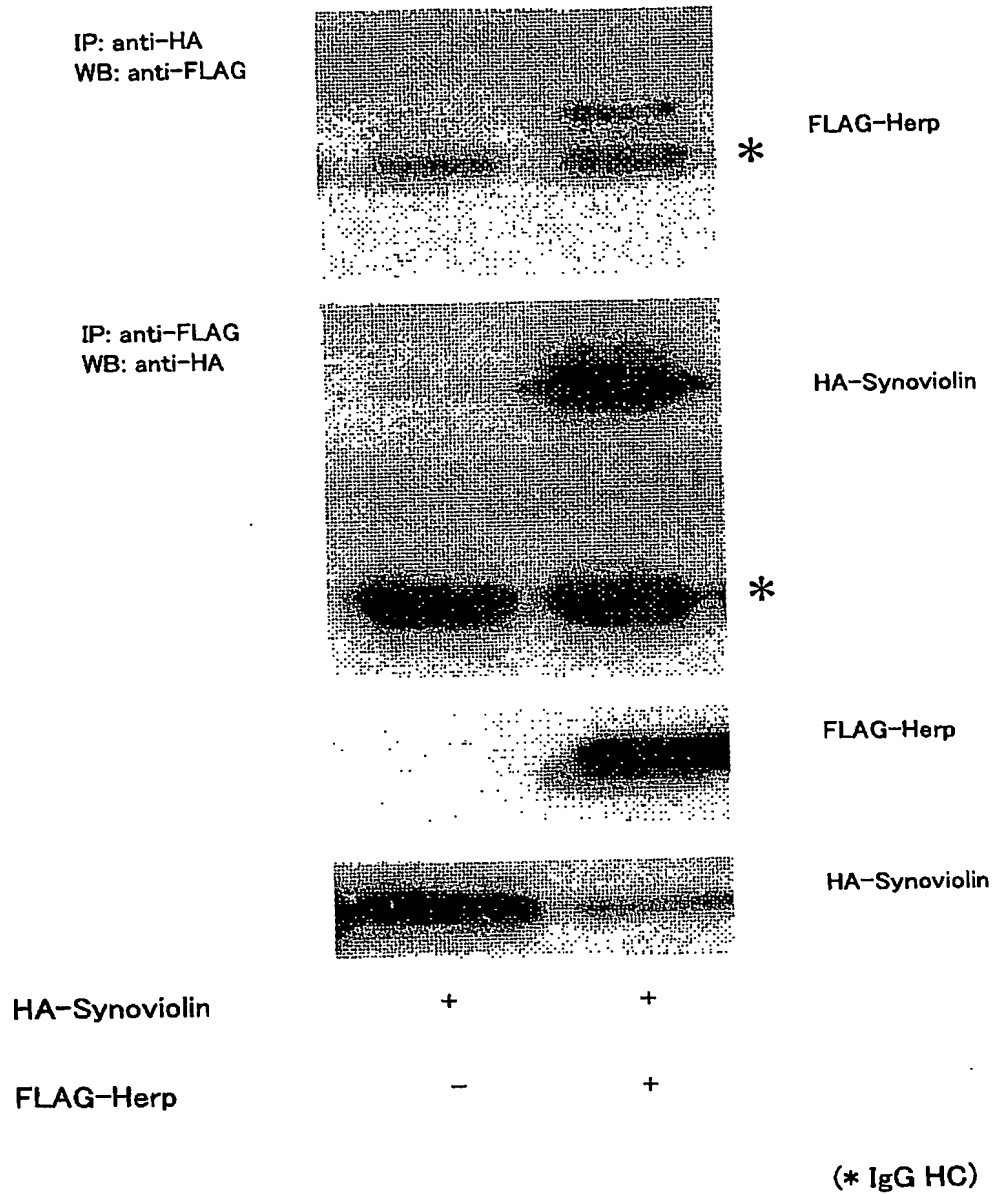
【図 2】



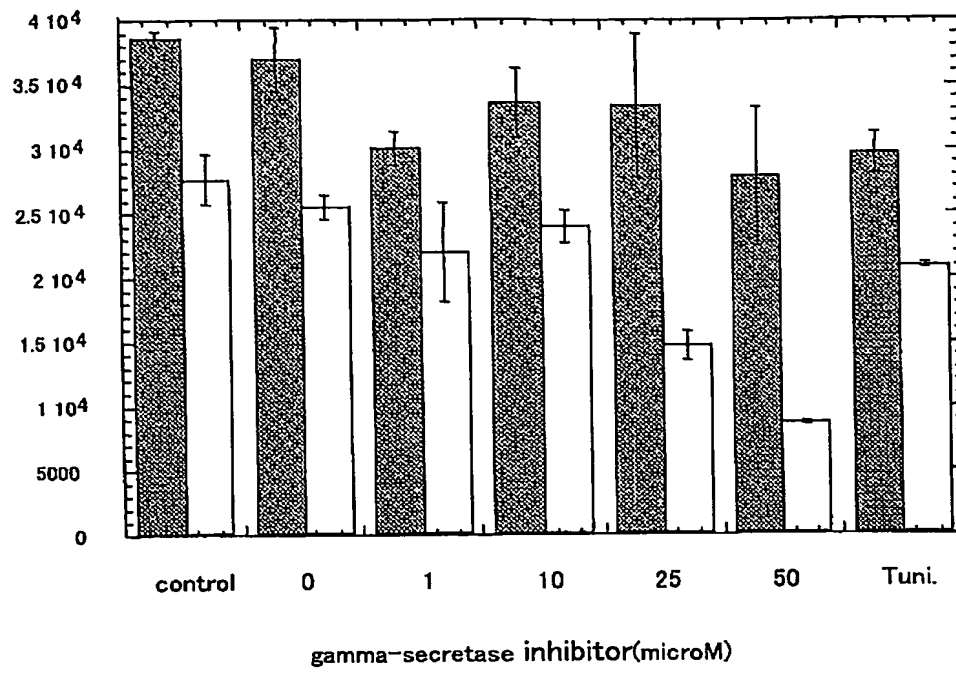
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 脳神経系疾患治療薬の提供。

【解決手段】 セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質を含む、医薬組成物。セクレターゼ阻害剤の感受性を促進する物質としては、シノビオリンの発現抑制物質（シノビオリンをコードする遺伝子に対するsiRNA又はshRNA）などが挙げられる。本発明の医薬組成物は、アルツハイマー病などの脳神経系疾患治療薬として有用である。

【選択図】 なし

特願 2003-359704

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [503302207]

1. 変更年月日 2004年 8月 6日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による抹消  
[統合先識別番号] 301050902  
住 所 東京都港区虎ノ門4-1-1 虎ノ門パストラル本館7階  
氏 名 株式会社ロコモジェン

特願 2003-359704

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [301050902]

1. 変更年月日 2004年 8月 6日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館  
7階  
氏 名 株式会社ロコモジェン
2. 変更年月日 2004年 8月 6日  
[変更理由] 識別番号の二重登録による統合  
[統合元識別番号] 503302207  
住 所 東京都港区虎ノ門4丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館  
7階  
氏 名 株式会社ロコモジェン



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**